

Der in Beispiel 3 genannte Vektor pCR2.1lysR3int wurde nach der Elektroporationsmethode von Tauch et.al. (FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) in Corynebacterium glutamicum DSM 5715 bzw. Brevibacterium lactofermentum FERM BP-1763 elektroporiert. Bei dem Stamm DSM 5715 handelt es sich um einen AEC resistenten Lysin-Produzenten. Bei dem Stamm FERM BP-1763 handelt es sich um einen Isoleucin und Methionin bedürftigen Valin-Produzenten. Der Vektor pCR2.1lysR3int kann in DSM 5715 bzw. FERM BP-1763 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn er ins Chromosom von DSM 5715 bzw. FERM BP-1763 integriert hat. Die Selektion von Klonen mit ins Chromosom integriertem pCR2.1lysR3int erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 15 mg/l Kanamycin supplementiert worden war.

Für den Nachweis der Integration wurde das lysR3int-Fragment nach der Methode "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert.

Chromosomale DNA eines potentiellen Integranten wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) isoliert und jeweils mit den Restriktionsenzymen SalI, SacI und HindIII geschnitten. Die entstehenden Fragmente wurden mit Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer bei 68°C hybridisiert. Das in Beispiel 3 genannte Plasmid pCR2.1lysR3int hatte innerhalb des chromosomalen lysR3-Gens ins Chromosom von DSM 5715 bzw. FERM BP-1763 inseriert. Die Stämme wurden als DSM5715::pCR2.1lysR3int bzw. FERM BP-1763::pCR2.1lysR3int bezeichnet.

Beispiel 5

Herstellung von L-Lysin und L-Valin

Die in Beispiel 4 erhaltenen *C. glutamicum* bzw. *B. lactofermentum* Stämme DSM5715::pCR2.1lysR3int und FERM BP-
5 1763::pCR2.1lysR3int wurden in einem zur Produktion von L-Lysin und L-Valin geeigneten Nährmedium kultiviert und der L-Lysin- bzw. L-Valingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

10 Dazu wurden die Stämme zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin (25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

Medium Cg III

NaCl 2,5 g/l

Bacto-Pepton 10 g/l

Bacto-Yeast-Extrakt 10 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4
eingestellt

15 Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 24 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur 0,1 OD betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM
20 verwendet

Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor) 5 g/l

MOPS	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50g/l
Salze:	
(NH ₄) ₂ SO ₄)	25 g/l
KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ * H ₂ O	5,0mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
CaCO ₃	25 g/l

5 CSL, MOPS und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen sowie das trocken autoklavierte CaCO₃ zugesetzt. Für die Kultivierung von DSM 5715 wurde dem Medium zusätzlich 0,1 g/l Leucin zugesetzt. Für die Kultivierung von FERM BP-1763 wurden zusätzlich 0,1 g/l Isoleucin und 0,1 g/l Methionin zugesetzt.

10 Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchtigkeit.

Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete L-Lysin- bzw. L-Valinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma

15

Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustausch-Chromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In den Tabellen 1 bzw. 2 sind die Ergebnisse des Versuchs
5 dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD(660)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	7,5	13,01
DSM5715::pCR2.1lysR3int	7,6	15,04

Tabelle 2

Stamm	OD(660)	Valin g/l
FERM BP-1763	12,1	7,49
FERM BP- 1763::pCR2.1lysR3int	12,5	8,67